Aus der Klinik für Innere Medizin der
Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. L. Demling

Zur experimentellen Chemotherapie eines menschlichen Adenokarzinoms, H.Ad.No.1, in der Backentasche des Goldhamsters.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Bernd Hindringer
aus Aschersleben

1967

1969 № 230

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535718_0047

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. K.G. Ober
Referent: Prof. Dr. S. Witte
Korreferent: Prof. Dr. L. Demling

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 6. 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Sonderdruck aus:

» ARZNEIMITTEL-FORSCHUNG «
»DRUG RESEARCH«
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) **19**, 281—287 (1969)
Editio Cantor KG / Aulendorf i. Württ.

Aus dem Krebsforschungslaboratorium der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg; ehemaliger Direktor: Professor Dr. N. Henning

Methodik und Ergebnisse der experimentellen Chemotherapie eines menschlichen Dickdarmcarcinoms (H. Ad. Nr. 1) in der Backentasche des Goldhamsters

Von David M. Goldenberg, Siegfried Witte und Bernd Hindringer*)

Die malignen Tumoren des Magendarmkanals sprechen auf die klinisch gebräuchlichen Cytostatica meist vergleichsweise gering oder überhaupt nicht an. In Einzelfällen sind objektivierbare Besserungen mit alkylierenden Substanzen beschrieben worden (z. B. [3]) und in letzter Zeit auch mit fluorierten Pyrimidinderivaten [1, 2]. Nachdem von menschlichen Coloncarcinomen dauerhafte Tumorstämme gewonnen werden konnten [4, 8, 17], die viele Merkmale des ursprünglichen Tumors der Patienten beibehalten hatten [4, 14, 18], ergab sich die Frage, ob solche Tumoren in einem Wirtstier chemotherapeutisch durch einige der klinisch wichtigsten Cytostatica beeinflußbar sind und sich als experimentelles Modell für Krebserkrankungen des Darmes zur Erprobung neuer Substanzen mit möglicher cytostatischer Wirkung eignen. Im Rahmen dieser Fragestellung soll chemotherapeutisch-methodischen Aspekten besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Methodik

Unsere Experimente wurden mit dem von Toolan [17] dauerhaft überpflanzten menschlichen Adenocarcinom des Dickdarms — H. Ad. Nr. 1 — durchgeführt, da zu dieser Zeit unsere eigenen Dickdarmtumorstämme GW-39 [8] und GW-77 [4] noch nicht zur Verfügung standen. Zur Überimpfung der Transplantate wurden 17—20 Tage alte Tumoren verwendet, die in der Backentasche nicht vorbehandelter Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) gewachsen waren. Nach Präparation und Excision wurden die soliden Tumoren mit der Hand homogenisiert, in einer streptomycin- (0,6 mg/ml) und penicillinhaltigen (100 E/ml) sterilen physiologischen Kochsalzlösung aufgeschwemmt und als 20%ige Suspension (Gewicht/Volumen) überpflanzt. Dazu wurden die Hamsterbackentaschen mit einer anatomischen Pinzette herausgestülpt, an ihren Enden mit einer sterilen Stecknadel auf einer Korkplatte fixiert und vorsichtig mit einer 30%igen alkoholischen Lösung gesäubert. Dann wurden je 0,1 ml der Tumorsuspension (etwa 20 mg Gewebe) in die Bindegewebsschichten beider Backentaschen injiziert. Es kamen männliche und weibliche Tiere — gewöhnlich aus gleicher Zucht — mit einem Gewicht von 45 bis 70 g zum Versuch. Sie erhielten eine Anästhesie für ca. 30 min mit Hexobarbital (100 mg/kg Körpergewicht ip.).

Zur fortlaufenden Kontrolle des Tumorverhaltens während längerer Zeit machten wir uns die einfache Möglichkeit der Beobachtung des Tumors „in situ" durch Herausstülpen der Backentasche zunutze und nahmen eine äußere Volumenmessung durch Bestimmung der Länge, Breite und Tiefe des Tumors mit einer kleinen Schublehre vor. Tumorvolumen und Körpergewicht aller Tiere wurden jeden zweiten bis dritten Tag gemessen.

Für die chemotherapeutischen Versuche wurde eine Anzahl Hamster, in deren Backentaschen die gleiche Suspension von Tumorgewebe transplantiert worden war, willkürlich in gleiche Gruppe eingeteilt: behandelte und Kontrolltiere. In einer Versuchsreihe wurden Testsubstanzen in verschiedener Konzentration oder verschiedene Substanzen parallel geprüft. Die Therapie setzte 8—9 Tage nach Überpflanzung ein, nachdem Tumorgröße und Gewicht zum zweiten Male bestimmt worden waren, und erstreckte sich über 7—8 aufeinanderfolgende Tage. Die Konzentration der zu testenden Mittel wurde so gewählt, daß die angewendete Dosis in 0,1 ml/10 g Körpergewicht einmal täglich ip. appliziert werden konnte. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge einer physiologischen Kochsalzlösung verabreicht.

Wir haben Cytostatica aus unterschiedlichen chemischen Gruppen verwendet, die alle bereits klinische Anwendung finden:

1. Triaziquonum**), Cyclophosphamid und Azatepum aus der Gruppe der Alkylantien,
2. Cactinomycin**) als Vertreter der Antibiotica mit cytostatischer Wirkung,
3. Fluoro-uracil, Methotrexat und Cytosin-Arabinosid†) als Antimetabolite und
4. Procarbazinhydrochlorid, ein Methylhydrazinderivat.

Zur Prüfung der Mittel wurden handelsübliche Ampullen verwendet†). Soweit die Substanzen in kristalliner Form vorlagen, wurden sie laut den beiliegenden Anweisungen gelöst und zur Herstellung der entsprechenden Konzentration mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Nach Bereitung injizierten wir die Lösungen sofort ip.; für jede Behandlung wurde eine frische Lösung angesetzt.

Die Tiere bekamen Altromin®-Futter mit Hühnerfutterzusatz und zweimal wöchentlich frische Karotten. Der Tierraum wurde bei Tages- und künstlichem Licht und einer Temperatur von etwa 22° C mit automatischer Frischluftzufuhr gehalten.

Ergebnisse

Verträglichkeit und Toxizität

Über die Verträglichkeit der verschiedenen Cytostatica beim Goldhamster gibt es unterschiedliche Angaben. Das dürfte einesteils darauf beruhen, daß der Goldhamster ein sehr empfindliches Versuchstier ist. Tiere verschiedener Stämme von verschiedenen Züchtern haben bereits eine unterschiedliche Reaktionslage. Auch eine geringe Umstellung in der Fütterung spielt eine Rolle. Andererseits ermitteln manche Autoren die Letaldosen an nicht tumortragenden Tieren und lassen damit die Belastung der Versuchstiere durch die Geschwulst außer acht [12]. Unsere Ergebnisse bei der Bestimmung der DL_{10} haben wir in Tab. 8 angeführt. Den

*) D 29.

**) Alphabetisches Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Substanzbezeichnungen und ihre chemische Definition:

Azatepum:	P,P-Bis-(1-aziridinyl)-N-äthyl-N-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-phosphinsäureamid; Azetepa
Cactinomycin:	Actinomycin C; Sanamycin®. Die Ergebnisse mit Sanamycin wurden zum großen Teil bereits an anderer Stelle mitgeteilt [10].
Cyclophosphamid:	N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäureester-diamid; Endoxan®
Fluoruracil:	5-Fluor-uracil; Fluoro-uracil „Roche"®
Methotrexate:	4-Amino-N¹⁰-methyl-pteroylglutaminsäure; Methotrexat®
Procarbazinhydrochlorid:	p-(N'-Methyl-hydrazinomethyl)-N-isopropylbenzamid; Natulan®
Triaziquonum:	2,3,5-Tris-äthylenimino-benzochinon-1,4; Trenimon®

†) Cytosin-Arabinosid wurde als Testsubstanz AC-1075 der Firma Heinrich Mack Nachf., Illertissen, verwendet. Siehe zu dieser Substanz auch das 19. Beiheft zur Arzneim.-Forsch. (Drug Res.): Experimentelle und klinische Erfahrungen mit Cytosin-Arabinosid bei soliden Tumoren und Haemoblastosen, hg. von S. Witte und R. Zahn, Editio Cantor, Aulendorf i. Württ., 1968.

Angaben in der Tabelle wurde eine Beobachtung der Tiere bis zum 8. Tag nach Therapieschluß zugrunde gelegt; die Verabreichung der Mittel erfolgte ip. an sieben bis acht aufeinander folgenden Tagen.

Über die toxische Wirkung der Substanzen unterrichtete einmal die Höhe des Gewichtsverlustes im Verhältnis zu den Kontrolltieren. (Der durchschnittliche Gewichtsverlust bei 29 Kontrollgruppen betrug 9,9%, drei Gruppen zeigten Gewichtszunahme.) Ferner kam es zu Schädigungen der Darmschleimhaut, die sich im Auftreten von Diarrhoen und Darmblutungen verschiedener Schweregrade manifestierten. Wahrscheinlich als Folge einer Affektion des hämopoetischen Systems wurden Eiterungen an der Backentasche — dort, wo sie zur Tumormessung mit einer Nadel fixiert worden war, — Mundbodenphlegmonen und eitrige Bindehautentzündungen festgestellt. Diese Erscheinungen traten vor allem bei der Therapie mit Cyclophosphamid auf, und zwar mit steigender Dosis in zunehmendem Maße. Bei sehr hoher Medikation (z. B. Triazequonum 0,2 mg/kg/die) waren die Backentaschen der Tiere anämisch, livide verfärbt und übelriechend; die Schleimhaut wies multiple Risse auf. Endlich war die Letalität der Versuchstiere ein Maßstab für die Toxizität der Präparate. Wir haben sie als „relative Letalität" aufgeführt, das heißt, Letalität der behandelten minus Mortalität der unbehandelten Tiere. Infolge der schon oben besprochenen Empfindlichkeit von Goldhamstern ist eine gewisse spontane Mortalitätsziffer nicht zu vermeiden, die durch die zusätzlichen Belastungen des Versuchs noch erhöht wird.

Fragen der Erfassung therapeutischer Effekte

Die Angehrate der überpflanzten Tumoren in der Backentasche war konstant und hoch. Über 90% der injizierten Tumorsuspensionen ergaben ein Tumorwachstum. Die erste verwertbare Messung ist am 6. bis 8. Tag nach Transplantation durchführbar. Der Meßfehler — prozentualer Fehler —, ermittelt durch jeweils zehnmaliges Messen verschiedener behandelter und Kontrolltumoren, nahm mit zunehmender Tumorgröße ab (Tab. 1). Bei den Messungen wurden die Backentaschen mindestens siebenmal neu fixiert, die beiden extremen Meßwerte wurden gestrichen.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß das mittels einer Schublehre gefundene Volumen nicht dem wahren Rauminhalt der Tumoren entspricht. Dieser läßt sich vielmehr nach der Formel eines abgeplatteten Sphäroids

$$V = 4/3\ \pi \times a/2 \times b/2 \times c/2$$

errechnen, wobei a, b und c die Kantenlängen sind. Auf die Ergebnisse hat dieser systematische Fehler jedoch keinen Einfluß.

Tab. 1: Meßfehler bei verschiedenen Tumorgrößen nach äußerer Volumenbestimmung.

Tage nach Transpl.	Anzahl der Messungen (n)	Mittelw. der Volumina in mm³ ($\bar{x}$)	Mittl. Fehler in mm³ ($\bar{x}$) ±	Prozent Fehler (σ)
7	10	106	8	7,6
9	10	264	18	7,1
12	10	480	20	4,1
14	10	677	24	3,6
16	10	1184	44	3,7

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse zeigte es sich, daß das Volumen bzw. Gewicht der Tumoren innerhalb einer Gruppe jeweils am gleichen Beobachtungstag eine erhebliche Streuung aufwies. Ein statistisch zuverlässiger Vergleich am Tage des Versuchsendes wäre also nur mit einer verhältnismäßig großen Anzahl von Tumoren in jeder Gruppe möglich gewesen. Damit war mit diesem Parameter eine Aussage über die chemotherapeutische Wirkung einer Substanz auf das Tumorwachstum bei der Verwendung von durchschnittlich 9—11 Tieren pro Gruppe nicht gegeben.

Demgegenüber ist die gleichmäßige Wachstumsrate von H. Ad. Nr. 1 in der Hamsterbackentasche — wie in Abb. 1 dargestellt — von besonderem Vorteil, weil sie trotz unterschiedlicher Größe gleichaltriger Tumoren über 1—3 Wochen nach der Überpflanzung fast konstant ist. Anstatt das Tumorvolumen als Funktion der Zeit aufzutragen, zogen wir es deshalb vor, die jeden zweiten bis dritten Tag gemessenen Volumina zum ursprünglichen, am 6. bis 8. Tag nach der Transplantation bestimmten Volumen desselben Tumors in Beziehung zu setzen. Wenn das Ausgangsvolumen gleich 1 gesetzt wird, so läßt sich jedes folgende Meßergebnis als ein Vielfaches davon („Wachstumsfaktor"; W. F.) ausdrücken. Bei dem exponentiellen Wachstum unseres Tumors ergibt sich dann beim Auftragen von

$$\log W.F. = \log V_t/V_o$$

gegen die Zeit eine Gerade (Abb. 1), d. h., die beiden genannten Größen sind proportional (V_t = Volumen zur Zeit t, V_o = Volumen am ersten Meßtag [10].

Die Streuung, mittlerer Fehler des Mittelwertes, wurde nach der Formel

$$\delta = \sqrt{\frac{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

errechnet. Sie lag bei den Wachstumsfaktoren der behandelten Tumoren etwas höher als bei denen der Kontrollen und betrug einen Tag nach Therapieabschluß 6—9% bzw. 4—7%. Abb. 2 soll an einem Beispiel die Variationsbreite graphisch veranschaulichen. Die pro-

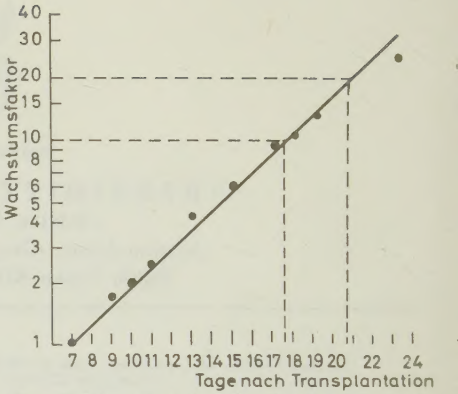

Abb. 1: Wachstumsrate von H. Ad. Nr. 1. Jeder Punkt entspricht dem Durchschnittswert von ca. 170 Tumoren verschiedener Generationen.

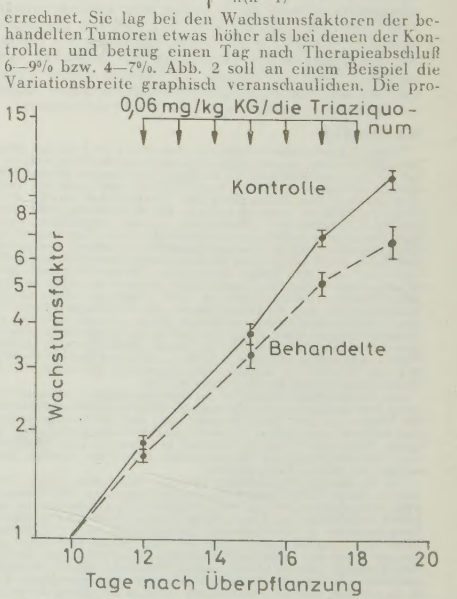

Abb. 2: Der Einfluß von Triaziquonum auf die Wachstumsrate von H. Ad. Nr. 1 (± Mittlerer Fehler des Mittelwertes).

zentuale Abweichung lag hier am Ende der Behandlung bei 9% (Behandelte) und 4% (Kontrollen). Tab. 2 zeigt einen Vergleich der mittleren Fehler des Mittelwertes in Prozent bei den Wachstumsfaktoren und Volumina einer anderen Versuchsgruppe. In der vierten Spalte kommt zum Ausdruck, um welchen Faktor die Streuung der Volumina größer ist als die der Wachstumsfaktoren.

Tab. 2: Vergleichende Zusammenstellung der Streuung (mittlerer Fehler des Mittelwertes) der Wachstumsfaktoren (W. F.) und Volumina bei einer Versuchsgruppe (20 Tumoren).

Tage nach Transplant.	Streuung der W. F. in %		Streuung der Volumina in %		Streuung Vol. / Streuung W. F.	
	Kontr.	Behand.	Kontr.	Behand.	Kontr.	Behand.
10	5	2	9	15	1,8	7,5
13	10	11	14	18	1,4	1,6
15	8	7	15	15	1,6	2,1
17	7	7	11	14	1,6	2,0
20	10	7	15	14	1,5	2,0

Nimmt man lediglich das absolute Tumorvolumen oder -gewicht als Meßgrößen zum Vergleich einer Gruppe behandelter Tumoren mit einer Kontrollgruppe, so sind Fehlschlüsse nicht zu vermeiden. Einmal wird bei der Gewichtsbestimmung das Verhalten des Tumors nur zu einem Zeitpunkt, dem Versuchsende, ermittelt. Das Ergebnis ist dabei in hohem Maße davon abhängig, wann der Tumor entfernt und gewogen wird. Eventuell frühere, vorübergehende oder später einsetzende Wachstumshemmungen können nicht erfaßt werden. Zum anderen wird die tatsächliche Größenzunahme der Geschwulst seit der Transplantation außer acht gelassen.

Daß die Annahme, gleiche Mengen einer in die Bakkentasche injizierten Tumorsuspension ergeben gleich große Tumoren, nicht zutrifft, wird bei der ständigen Beobachtung des Tumorverhaltens zur Errechnung der Wachstumsfaktoren offensichtlich. 6—8 Tage nach der Transplantation sind die angegangenen Tumoren verschieden groß; die relative Größenzunahme dieser (nunmehr gemessenen) Geschwülste ist jedoch fast konstant. Ein Tumor, der beispielsweise am 9. Tag nach Überpflanzung ein durch äußere Messung ermitteltes Volumen von 80 mm³ hat und am 18. Tag 830 mm³ umfaßt, erfuhr die gleiche relative Größenzunahme (Wachstumsfaktor 10.4) wie ein anderer mit Volumina von 120:1260 mm³ (Wachstumsfaktor 10,5). Der bloße Vergleich der Tumorinhalte würde aber beim ersten ein geringeres Wachstum vermuten lassen. Damit läßt auch ein Vergleich der Tumorgrößen (durch Gewichts- und Volumenbestimmung) bei einer nicht sehr großen Anzahl von Tieren am Versuchsende keine verläßlichen Schlüsse über mögliche Wachstumsminderung nach Behandlung mit einer cytostatisch wirksamen Substanz zu. Die Ursache der unterschiedlichen Größe der Transplantate nach der Überimpfung ist in erster Linie darin zu suchen, daß die Zahl der lebenden überpflanzbaren Zellen verschieden ist, die Zahl der anwachsenden Zellen ebenfalls nicht gleich ist und schließlich eine unbestimmbare Menge der Tumorsuspension durch Manipulationen der Tiere durch den Stichkanal aus dem Gewebe der Backentaschen herausgedrückt wird.

Das kontinuierliche Wachstum von H. Ad. Nr. 1 in der Backentasche des Goldhamsters läßt sich besonders gut an einem über zwei Monate gezüchteten Tumor demonstrieren (Abb. 3; die Wachstumskurve dieses Tumors ist fast deckungsgleich mit einer Durchschnittskurve von 170 Tumoren aus verschiedenen Generationen, s. Abb. 1). In der Regel kommt es jedoch nicht zu diesem ausgedehnten Wachstum, da die Geschwülste bei zunehmender Größe wegen mechanischer Beeinträchtigung und mangelnder Gefäßversorgung nekrotisch zerfallen; seltener erliegen die Tiere einer Kachexie.

Die Wirksamkeit der einzelnen Substanzen auf das Wachstum der Tumoren haben wir durch Bestimmung der Hemmung H ermittelt. Das Ausmaß der Hemmung

Abb. 3: Durch Aufschneiden der Backentasche freigelegter H.Ad. Nr. 1-Tumor, zwei Monate nach Transplantation; der Tumor hat ein Gewicht von 16 g.

wurde durch das Verhältnis des durchschnittlichen Wachstumsfaktors von behandelter zur Kontrollgruppe nach der Formel

$$H = 100 - W_b/W_c \times 100$$

(wobei W_b = Wachstumsfaktor der behandelten Tumoren, W_c = Wachstumsfaktor der Kontrolltumoren ist) errechnet.

Die in Tab. 3—7 angeführten Hemmwerte beziehen sich auf den ersten Tag nach Therapieschluß. Sie geben einen prinzipiellen Anhaltspunkt darüber, ob es kurz nach einem Behandlungsversuch überhaupt zu einer Wirkung auf die Tumorzellen kommt und wie groß sie ist.

Wirkung verschiedener Cytostatica

Die Wirkung der geprüften Cytostatica auf das Tumorwachstum und auf den Organismus der Versuchstiere war unterschiedlich. Während manche Mittel bereits in gut verträglichen Dosen eine Hemmung ausübten, zeigten andere erst in toxischen Bereichen eine Wirkung auf den Tumor. Einige waren ohne jeglichen therapeutischen Effekt. Bei einer wirkungsvollen Therapie konnten wir mehr oder weniger anhaltendes Sistieren des Tumorwachstums registrieren, und in einzelnen Fällen kam es auch zu einer meßbaren Rückbildung der behandelten Tumoren (bei Cactinomycin 0.05—0,12 mg/kg/die; Fluoro-uracil 33 und 40 mg/kg/die; Triaziquonum 0,06—0.2 mg/kg/die; Cyclophosphamid 70—80 mg/kg/die). Total-Remissionen wurden niemals beobachtet, ganz gleich, in welcher Höhe dosiert wurde. Dabei war es interessant, daß die Hemmung immer nur bis zu einem bestimmten — bei den einzelnen Mitteln verschiedenen — Bereich gebracht werden konnte und dann, trotz Erhöhung bis zu einer toxischen Dosis, nicht mehr zu verbessern war.

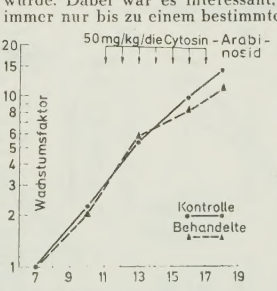

Abb. 4: Tumorwachstum von H.Ad. Nr. 1 bei toxischer Dosis von Cytosin-Arabinosid.

Daß es häufig erst bei toxischen Dosen zu einer Wachstumsminderung kommt, könnte zu dem Schluß führen, es handele sich dabei um einen unspezifischen Effekt im Zusammenhang mit der Kachexie.

Tab. 3: Hemmung des Wachstums von H.Ad. Nr. 1 durch 3 alkylierende Substanzen bei verschiedenen Dosierungen.

Tagesdosis (mg/kg)	Behandlungsdauer (Tage)	Gesamtdosis (mg/kg)	Anzahl der Versuche	Mittlere Gew.-Änderung in % (Beh./Kontr.)	Relative Letalität (%) 1 Tag n. Therapie	Relative Letalität (%) 8 Tage n. Therapie	Hemmung H in % 1 Tag n. Therapie
Triaziquonum							
0,03	7	0,21	1	—13/—7	0	0	19
0,05	7	0,35	1	—17/—4	0	5	25
0,06	7	0,42	2	—15/—8	0	7	32—36
0,10	7	0,70	2	—27/—7	15	25	51—52
0,15	7	1,05	2	—25/—10	30	75	65—67
0,20	6	1,20	1	—32/—7	51	85	66
Cyclophosphamid							
40	7	280	2	—11/—7	0	12	28—40
50	7	350	2	—13/—7	10	20	35—50
60	7	420	3	—25/—12	15	30	39—44
70	7	490	2	—24/—10	15	100	51—62
75	6	450	2	—27/—5	35	90	60—65
80	6	480	2	—31/+11	66	100	61—68
Azatepum							
2,5	7	17,5	1	—18/—4	0	15	12
3,5	7	24,5	2	—8/—6	0	10	26—33
5,0	7	35,0	1	—20/—8	15	20	30
7,5	7	52,5	2	—22/—8	10	35	33—35
10,0	7	70,0	2	—21/—3	25	66	30—36
15,0	3	45,0	1	—25/—9	0	85	32

In Abb. 4 soll daher gezeigt werden, daß eine Intoxikation mit ihren bekannten Erscheinungen bei den Versuchstieren nicht notwendigerweise zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt. Im angeführten Beispiel verloren die Hamster über ein Drittel ihres Ausgangsgewichtes, am 4. Tag nach Therapie waren bereits alle Tiere verendet. Die Wachstumshemmung der behandelten Tumoren betrug jedoch nur 23%.

Die Resultate der einzelnen Versuche wurden in Tabellen zusammengefaßt, die einen Vergleich der Wirkung einer Substanz bei verschiedenen Dosierungen gestatten. Ist in der Spalte „Hemmung" ein Bereich angegeben, so wurden hier jeweils die minimalen und maximalen Hemmwerte aus mehreren Versuchen mit gleicher Dosis aufgeführt.

Wie aus Tab. 3 zu ersehen ist, wurde Triaziquonum in Mengen von 0,03 bis 0,2 mg/kg Körpergewicht (KG) pro die verabreicht. Bei den durchgeführten Experimenten erwies sich eine siebenmalige Applikation von 0,06 mg/kg KG als optimale Dosis mit einer Hemmung von ca. 35%. Bis zu einer Gesamtdosis von 0,8 bis 1,0 mg/kg KG nahm die Hemmung proportional der Dosis zu, war dann jedoch nicht mehr zu steigern. Sie lag maximal zwischen 65 und 70%, konnte jedoch nur auf Kosten hoher Letalität erzielt werden. Bereits bei einer Gesamtdosis von 0,7 mg/kg KG starben ein Viertel der Versuchstiere. Abb. 5 verdeutlicht den Hemmeffekt bei 0,06 mg/kg KG/die Triaziquonum.

Mit Cyclophosphamid haben wir ebenfalls keine besonders guten Resultate erreichen können. Zwischen 40 und 50 mg/kg KG/die war die Dosis mit den besten therapeutischen Ergebnissen zu suchen; schon bei 7×60 mg/kg KG überlebten nur 70% der Tiere (Tab. 3). Abb. 6 läßt die Wachstumshemmung bei einer Gesamtdosis von 280 mg/kg KG Cyclophosphamid erkennen. Mehr oder weniger gut tolerierte Dosen von 2,5 bis 3,5 mg/kg KG Azatepum ergaben Hemmungen zwischen 12 und 33% (Tab. 3). Höhere Dosen zeigten lediglich höhere Letalität, jedoch keine bessere Hemmung. In Abb. 7 wurde der Kurvenverlauf bei einer Behandlung mit insgesamt 52,5 mg/kg KG Azatepum dargestellt. Selbst bei dieser toxischen Menge wurde der Tumor in seinem Wachstum nur gering beeinflußt. Sofort nach Absetzen des Medikaments konvergieren die Kurven. Die Wirkung von Azatepum klingt also schnell wieder ab.

Aus Tab. 4 geht die deutliche Einwirkung von Actinomycin C auf unseren Tumor hervor. Durch die DL_{10} wird das Tumorwachstum durchschnittlich um 70% gehemmt, während als Nebenerscheinungen lediglich gehäufte Diarrhoen auftreten. Abb. 8 zeigt das stark gebremste Wachstum der behandelten Tumoren bei einer Gesamtdosis von 0,7 mg/kg KG Actinomycin C. Auch schon bei einer Therapie mit der Hälfte dieser Dosis kam es zu einer sichtbaren Wachstumsminderung. Am flacheren Verlauf der Wachstumskurven der behandelten Tumoren erkennt man in Abb. 9, daß der cytostatische Effekt noch am 8. Tag nach Beendigung der Therapie anhält.

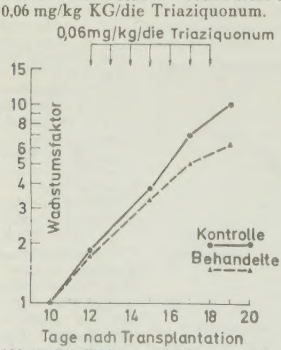

Abb. 5: Die Wirkung von 0,42 mg/kg KG Triaziquonum auf H.Ad. Nr. 1.

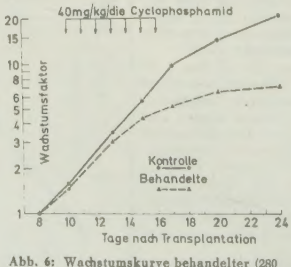

Abb. 6: Wachstumskurve behandelter (280 mg/kg KG Cyclophosphamid) und unbehandelter H.Ad. Nr. 1-Tumoren.

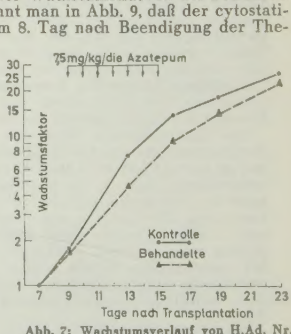

Abb. 7: Wachstumsverlauf von H.Ad. Nr. 1-Tumoren nach einer Behandlung mit 52,5 mg/kg Körpergewicht Azatepum.

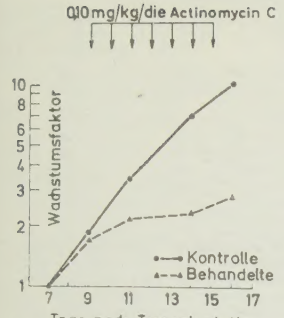

Abb. 8: Wachstumskurve behandelter (GD 0,7 mg/kg KG Actinomycin C) und unbehandelter H.Ad. Nr. 1-Tumoren.

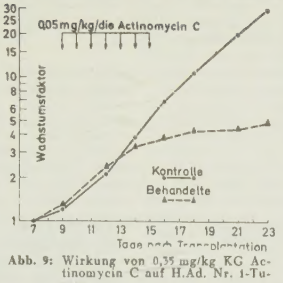

Abb. 9: Wirkung von 0,35 mg/kg KG Actinomycin C auf H.Ad. Nr. 1-Tumoren.

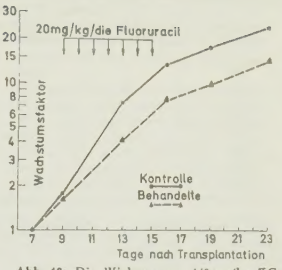

Abb. 10: Die Wirkung von 140 mg/kg KG Fluoruracil auf H.Ad. Nr. 1.

Weitaus geringer sind die Erfolge, die wir mit antimetabolisch wirkenden Chemotherapeutica erzielten (Tab. 5). So konnnte Fluoruracil zwar unbedenklich als 0,2%ige Lösung sieben Tage lang injiziert werden (20 mg/kg KG/die), die Hemmung lag aber in der Mehrzahl der Fälle unter 40%. Bereits 30 mg/kg KG hatten jedoch, bei durchschnittlicher Wachstumshemmung von 47%, eine beträchtliche Letalität zur Folge. In Abb. 10 ist der Kurvenverlauf nach Behandlung mit 20 mg/kg KG Fluoruracil dargestellt.

Methotrexat hatte in verträglichen Dosen keinen wesentlichen Einfluß auf den soliden Testtumor und bei einer Hemmung von 44% überlebten nur weniger als 50% der Versuchstiere den 8. Tag nach Therapieabschluß.

Ebenso waren die Erfolge mit Cytosin-Arabinosid kaum nennenswert. Die Tumoren zeigten — bei dieser Dosierungsweise — mitunter sogar im weiteren Verlauf ein schnelleres Wachstum als die Kontrollen. Andererseits hatte es den Anschein, daß Cytosin-Arabinosid einen konservierenden Einfluß auf die Tumoren ausübte. Bei niederen Dosen kam es nämlich über längere Zeit gesehen zu sehr großen Tumoren, die Volumina von 2500 bis 3000 mm³ aufwiesen, während unbehandelte Tumoren im allgemeinen schon bei geringerem Ausmaße nekrotisch werden. Abb. 11 zeigt die Wirkung dieses Medikamentes auf H.Ad. Nr. 1 bei Behandlung mit 20 mg/kg KG über 7 aufeinanderfolgende Tage. Der fast deckungsgleiche Kurvenverlauf läßt hier keine cytostatische Wirkung erkennen.

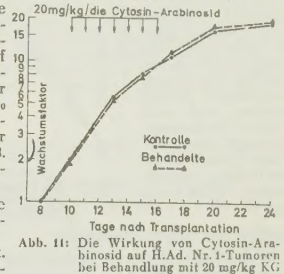

Abb. 11: Die Wirkung von Cytosin-Arabinosid auf H.Ad. Nr. 1-Tumoren bei Behandlung mit 20 mg/kg KG über sieben Tage.

Tab. 4: Hemmung des Wachstums von H.Ad. Nr. 1 durch Actinomycin C in verschiedenen Dosierungen.

Tagesdosis (mg/kg)	Behandlungsdauer (Tage)	Gesamtdosis (mg/kg)	Anzahl der Versuche	Mittlere Gew. Änderung in % (Beh./Kontr.)	Relative Letalität in % 1 Tag n. Therapie	Hemmung H in % 1 Tag n. Therapie
0,03	8	0,24	2	—11/—8	0	4—12
0,05	7	0,35	1	—24/—10	0	43
0,06	7	0,42	1	—6/+13	0	50
0,085	7—8	0,595—0,680	3	—12/+13	5	64—70
0,10	7	0,70	6	—17/—7	12	64—75
0,12	7	0,84	2	—34/—10	25	67—70

Tab. 5: Hemmung des Wachstums von H.Ad. Nr. 1 durch 3 Antimetabolite bei verschiedenen Dosierungen.

Tagesdosis (mg/kg)	Behandlungsdauer (Tage)	Gesamtdosis (mg/kg)	Anzahl der Versuche	Mittlere Gew. Änderung in % (Beh./Kontr.)	Relative Letalität (%) 1 Tag n. Therapie	Relative Letalität (%) 8 Tage n. Therapie	Hemmung H in % 1 Tag n. Therapie
Fluoro-Uracil							
15	7	105	4	—13/—6	0	0	16—30
20	7	140	2	—17/—6	0	12	33—39
30	7	210	2	—18/—8	0	35	45—51
35	6	210	1	—30/—4	30	50	50
40	6—7	240—280	2	—32/—14	60	100	61—65
50	6	300	1	—48/—4	85	100	67
Methotrexat							
0,5	7	3,5	1	— 9/—10	0	0	12
1,0	7	7,0	2	— 9/0	0	12	18—23
1,5	7	10,5	1	—18/—10	30	52	44
2,0	7	14,0	2	—20/—1	40	75	17—38
3,0	7	21,0	1	—28/—1	70	90	52
3,5	7	24,5	1	—20/—2	30	85	57
4,0	6	24,0	1	—35/—1	40	75	50
Cytosin-Arabinosid							
10	7	70	1	—10/—2	0	0	0
20	7	140	2	—13/—2	0	8	12—18
25	7	175	1	—15/—8	0	10	15
30	7	210	1	—13/—2	15	25	17
40	7	280	2	—13/—2	15	25	15—18
50	7	350	1	—32/—11	60	100	23

Tab. 6: Hemmung des Wachstums von H.Ad. Nr. 1 durch Procarbazinhydrochlorid bei verschiedenen Dosierungen.

Tagesdosis (mg/kg)	Behandlungsdauer (Tage)	Gesamtdosis (mg/kg)	Anzahl der Versuche	Mittlere Gew. Änderung in % (Beh./Kontr.)	Relative Letalität (%) 1 Tag n. Therapie	Relative Letalität (%) 8 Tage n. Therapie	Hemmung H in % 1 Tag n. Therapie
30	7	210	1	—10/—6	0	0	15
50	7	350	2	—16/—6	0	0	18—20
75	7	525	2	—26/—6	0	10	12—28
100	7	700	2	—27/—4	15	40	24—40
125	7	875	1	—27/—6	15	85	43
150	7	1050	1	—34/—5	15	75	48
200	7	1400	2	—32/—5	50	100	47—49
250	7	1750	2	—28/—4	10	100	49—53

Daß Procarbazinhydrochlorid unter unseren Versuchsbedingungen ohne therapeutischen Wert ist, geht aus Tab. 6 hervor; Abb. 12 zeigt die Wirkung von 30 mg/kg KG/die. Es konnte inzwischen gezeigt werden, daß auch andere Dosierungsschemata bei diesem Tumor ohne deutlichen cytostatischen Effekt waren [7].

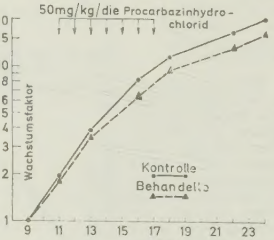

Abb. 12: Die Wirkung von 350 mg/kg Körpergewicht Procarbazinhydrochlorid auf H.Ad. Nr. 1.

Einfluß der Applikationsweise

In der Regel setzte die Behandlung am 8. oder 9. Tag nach Transplantation ein. An einem Beispiel haben wir gesehen, daß der Therapiebeginn keinen bedeutenden Einfluß auf die Wirksamkeit des Medikamentes hatte. So konnten wir bei Tumoren, die mit 0,12 mg/kg KG/die Actinomycin C behandelt wurden, annähernd die gleiche Hemmung erzielen, wenn die Behandlung erst am 16. Tag nach der Überpflanzung begann. Die Substanzen wurden einmal täglich ip. verabreicht. Bei anderen Applikationsformen könnten sich andere Resultate ergeben, wie bereits für Cytosin-Arabinosid gefunden worden ist [11].

In einer Versuchsreihe mit Procarbazinhydrochlorid haben wir parallel zur ip. Applikation subcutan behandelt und dabei übereinstimmende Ergebnisse bekommen. Diese Experimente wurden im Zusammenhang mit einer Veröffentlichung von Grunberg u. Prince [13] durchgeführt [7]. Unter Zugrundelegung der Tumorgewichte ermittelten die Autoren unter annähernd gleichen Versuchsbedingungen wie wir nach subcutanen Injektionen von 30 mg/kg KG/die Procarbazinhydrochlorid eine Wachstumsminderung um 60%. Dazu führten sie einen „inhibition index" ein, den Quotienten aus dem Gewicht der Kontrolltumoren und dem Gewicht der behandelten. Beim Nachprüfen dieser Versuche haben wir einmal eine Wachstumsminderung von 5% erhalten, ein anderes Mal waren die behandelten Tumoren 33% schwerer als die Kontrollen; bewertet nach unserer Methode betrug die Hemmung in beiden Fällen 10 bzw. 15% und lag damit in dem Bereich, den die ip. Behandlung mit dieser Dosis ergab. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Grunberg u. Prince ist sicherlich damit zu erklären, daß das Tumorgewicht wegen seiner großen Streubreite als Vergleichsgröße nicht geeignet ist (s. a. Tab. 7).

Diskussion

Die Möglichkeit der dauerhaften Überpflanzbarkeit und die hohe Angehrate von H. Ad. Nr. 1 in der Bakkentasche von Goldhamstern sowie das rasche und kontinuierliche Wachstum der Geschwulst lassen diesen — und andere ähnliche Humantumoren wie GW-39 und GW-77 — als Testmodell für chemotherapeutische Versuche besonders geeignet erscheinen [4, 6, 9]. Es ist besonders vorteilhaft, daß man bei der Züchtung der Transplantate auf eine Vorbehandlung der Tiere mit Cortison verzichten kann. Das schließt eine Fehlerquelle aus, die durch Interferieren der Glucocorticoide mit der Aktivität der Testsubstanzen, dem Wirtsorganismus wie auch mit dem Tumorwachstum gegeben sein könnte. Das Fortbestehen menschlicher Antigeneigenschaften und Chromosomenmuster [4, 14, 18] bei der heterologen Überimpfung macht die Versuchsergebnisse mit diesem Adenocarcinom für klinische Fragestellungen besonders wertvoll. Wie aus Tab. 8 zu entnehmen ist, brachte die Mehrzahl der getesteten Mittel in tolerierbaren Dosen keine befriedigenden Ergebnisse. Triaziquonum und Cyclophosphamid lassen zwar einen Einfluß auf den Tumor erkennen; mit einer durchschnittlichen Hemmung von nur 35—40% bei einer DL_{10} im Experiment dürfte aber eine Anwendung dieser Substanzen in der klinischen Therapie solider Tumoren des Verdauungstraktes wenig aussichtsreich erscheinen. Auch die wenig überzeugenden Erfolge mit Azatepum in der Klinik fanden bei uns analoge Resultate.

Nach dem heutigen Stand der Chemotherapie des Coloncarcinoms wird dem Fluoro-uracil eine gewisse Bedeutung beigemessen [1, 2, 15, 16]. Bei kritischer Betrachtung sind es jedoch nicht mehr als 20% der Fälle, bei denen eine vorübergehende Remission aufgetreten ist. In unseren Versuchen lag die Wirkung von Fluoro-uracil in der gleichen Größenordnung wie Triaziquonum und Cyclophosphamid. In tumorwirksameren Dosen wurde das Mittel aber vom Hamster nicht vertragen. Auch die übrigen Antimetabolite sowie Procarbazinhydrochlorid waren ohne deutlichen Effekt bei H. Ad. Nr. 1-Tumoren. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß andere Applikationsweisen oder Dosierungsschemata solche Resultate verändern können.

Dagegen erwies sich Actinomycin C als wirksames Mittel bei der Behandlung dieses Adenocarcinoms. In Anbetracht der guten Verträglichkeit und hohen Hemmwirkung legen die Ergebnisse eine klinische Überprüfung dieser Substanz, besonders bei Tumoren des Darmtraktes, nahe, wie bereits an anderer Stelle vorgeschlagen wurde [6, 9, 10].

Dieses Humantumor-Hamsterwirt-Modell, dessen geringe Empfindlichkeit in Einklang steht mit seinem verhältnismäßig hohen Differenzierungsgrad, spiegelt die bekannten Erfahrungen der Klinik wider und bie-

Tab. 7: Wachstumshemmung von H.Ad. Nr 1 durch 30 mg/kg KG/die Procarbazinhydrochlorid bei ip. und sc. Applikation. Vergleich zwischen Hemmung H und „inhibition index" nach Grunberg und Prince [13].

Tagesdosis (mg/kg)	Behandlungsdauer (Tage)	Behandlungsbeginn (Tage n. Transpl.)	Gesamtdosis (mg/kg)	Mittlere Gew. Änderung in % (Beh./Kontr.)	Durchschnittl. W. F. (Beh./Kontr.)	Durchschnittl. Tumor-Gewicht (g) (Beh./Kontr.)	Hemmung H in %	„Inhibition index" C/T	Relative Letalität in %
30 ip.	7	11	210	—10/—6	9,7/11,3	—	15	—	0
30 sc.	7	6	210	—14/+2	12,0/13,4	0,90/0,95	10	1,05	0
30 sc.	7	11	210	—20/—8	16,8/19,9	2,06/1,57	15	0,76	0
30 sc.	12	1	360	—18/+2	10,2/13,4	1,06/0,95	24	0,89	0

tet somit die Möglichkeit, cytostatische Effekte an menschlichen Krebsgeweben in vivo testen zu können [5].

Zusammenfassung

Es werden Beobachtungen über das Wachstumsverhalten eines heterotransplantierten menschlichen Adenocarcinoms des Colons — H. Ad. Nr. 1 — in der Bakkentasche des unkonditionierten Goldhamsters mitgeteilt. Dieser Tumor eignet sich wegen seiner hohen Angehrate, seines kontinuierlichen Wachstums und der Beibehaltung menschlicher Antigeneigenschaften und Chromosomenmuster besonders gut als Testmodell für chemotherapeutische Versuche. Es wurde deshalb eine verläßliche Methode zur präklinischen Austestung möglicher cytostatischer Mittel entwickelt. Ihr liegt die Bestimmung eines Wachstumsfaktors zugrunde, der die relative Größenzunahme der Tumoren erfaßt. Die darauf basierende Ermittlung der Wachstumshemmung behandelter Tumoren ermöglicht eine sichere Aussage über die Wirksamkeit eines Cytostaticums.

Geprüft wurden Cytostatica, die bereits klinische Anwendung finden: Triaziquonum, Cyclophosphamid und Azatepum aus der Gruppe der Alkylantien, die Antimetabolite Fluoruracil, Methotrexat und Cytosin-Arabinosid, außerdem Actinomycin C und Procarbazinhydrochlorid. Die Mittel wurden in verschiedener Höhe dosiert; die DL_{10} beim tumortragenden Goldhamster wurde bestimmt. Aus der Reihe der getesteten Cytostatica ragte das Actinomycin C wegen seiner guten therapeutischen Erfolge bei der Behandlung dieses soliden Tumors heraus. Mit den in der klinischen Literatur angegebenen Resultaten für Fluoro-uracil konnte keine Übereinstimmung gefunden werden. Triaziquonum und Cyclophosphamid hatten keine überzeugende Wirkung auf H. Ad. Nr. 1. Die übrigen Substanzen (Azatepum, Cytosin-Arabinosid, Methotrexat und Procarbazinhydrochlorid) ließen bei der von uns angewendeten Applikationsweise einen deutlichen tumorhemmenden Effekt vermissen.

Summary

Method and Results in the Experimental Chemotherapy of a Human Colonic Carcinoma (H.Ad. No. 1) in the Cheek Pouch of the Golden Hamster

The growth behavior of a heterotransplanted human adenocarcinoma of the colon, H. Ad. No. 1, in the cheek pouch of unconditioned golden hamsters is described. Due to its high "take" rate, its constant growth pattern, and its retainment of human antigen and chromosome properties, this tumor system is a particularly suitable test model for preclinical chemotherapy screening. A testing method based on the determination of a growth factor, which expresses the relative increase in tumor size with time, has been developed. By comparing the mean growth factors of the treated and control tumors, the growth inhibitions obtained can be easily calculated and are used as a measure of the efficacy of a particular cancerostatic agent.

Antitumor agents in current clinical use were tested: triaziquone, cyclophosphamide, and azatepum among the alkylating agents, the antimetabolites fluorouracil, methotrexate and cytosine arabinoside, as well as actinomycin C and procarbazine hydrochloride. These drugs were given in various dosages as a single daily i.p. injection. The LD_{10} levels for these agents were determined in tumor-bearing hamsters so as to permit comparison of antitumor effects at equitoxic doses. Among the agents tested, actinomycin C was the most effective in retarding the growth rate of this solid neoplasm. Reported clinical data indicating activity of fluorouracil in the treatment of intestinal cancer could not be confirmed in this study. Triaziquone and cyclophosphamide did not have impressive growth-inhibitory activity against H. Ad. No. 1. The remaining substances (azatepum, cytosine arabinoside, methotrexate, and procarbazine hydrochloride) did not show any definite antitumor effects at the drug application schedules employed.

Literatur

[1] Ansfield, F. J., Proc. Amer. Ass. Cancer Res. **4**, 2 (1963)
[2] Ansfield, F. J. and Curreri, A. R., J. nat. Cancer Inst. **22**, 497 (1959)
[3] Bateman, J. C., Ann. N.Y. Acad. Sci. **68**, 1057 (1958)
[4] Goldenberg, D. M., Arch. Geschwulstforsch. **29**, 1, 18 (1967)
[5] Goldenberg, D. M., 4th Ann. Meeting, Amer. Soc. Clin. Oncology, Abstract No. 12 (1968)
[6] Goldenberg, D. M. u. Witte, S., Europ. J. Cancer **3**, 93 (1967)
[7] Goldenberg, D. M. u. Witte, S., Experientia **23**, 254 (1967)
[8] Goldenberg, D. M., Witte, S. u. Elster, K., Transplantation **4**, 760 (1966)
[9] Goldenberg, D. M., Witte, S. u. Elster, K., Krebsforsch. Krebsbekämpf. **6**, 156 (1967)
[10] Goldenberg, D. M., Witte, S., Hindringer, B. u. Hartmann, G., Arneim.-Forsch. (Drug Res.) **16**, 808 (1966)
[11] Goldenberg, D. M. et al., in: 1. Cytosin-Arabinosid-Symposion, hg. von Witte, S. u. Zahn, R., Aulendorf Editio Cantor, 1968, S. 31
[12] Griswold, D. P., pers. Mitteilung (1966)
[13] Grunberg, E. u. Prince, H. N., Experientia **22**, 324 (1966)
[14] Haley, H. B. u. Stroud, A. N., Cancer Res. **24**, 639 (1964)
[15] Hyman, G. A., Ultmann, J. E. u. Habif, D. V., Cancer Chemother. Rep. **16**, 397 (1962)
[16] Moertel, C. G. u. Reitemeier, R. J., Surg. Clin. N. Amer. **47**, 929 (1967)
[17] Toolan, H. W., Cancer Res. **17**, 418 (1957)
[18] Yohn, D. S., Hammon, W. McD., Atchison, R. W. u. Casto, B. C., Cancer Res. **22**, 443 (1962)

Für die Verff.: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. D. M. Goldenberg, Department of Pathology, University of Pittsburgh, School of Medicine, Pittsburgh, Pa. 15 213 (U.S.A.)

Verantwortlich für die Redaktion: Dr. W. Saenger, Verlag: Editio Cantor, 796 Aulendorf i. Württ.; Ruf: Aulendorf (07525) 451
Druck: Vereinigte Buchdruckereien, August Sandmaier & Sohn, 7952 Bad Buchau a. F.
Bezugsbedingungen: Die Zeitschrift erscheint monatlich einmal. Sie kann vom Verlag oder durch eine Buchhandlung bezogen werden. Der Bezugspreis beträgt im Abonnement pro Halbjahr (6 Hefte) 58,— DM zuzügl. Versandkosten. Das Einzelheft kostet 6,50 DM zuzügl. Versandkosten. Kostenlose Probehefte liefert der Verlag auf Anforderung. Auslandsabonnements errechnen sich pro Jahr zuzügl. Versand auf der Basis von 84,— DM.

LEBENSLAUF

7.08.38 geboren in Aschersleben als Sohn des damaligen Amtsarztes Dr. Philipp Hindringer und seiner Ehefrau Elisabeth, Röntgenassistentin.

30.05.56 Reifeprüfung an der Thomas-Müntzer-Oberschule zu Aschersleben.

1.05.57 nach Ablegung einer Ergänzungsprüfung für Ostabiturienten, Studium der Medizin in Freiburg im Breisgau.

1.11.58 Fortsetzung des Studiums in Erlangen, 1960 Physikum

24.08.64 Mediznisches Staatsexamen an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen. Vom Oktober 1964 bis zum September 1966 Ableistung der Medizinalassistentenzeit an der Medizinischen Universitätsklinik in Erlangen, dem Kreiskrankenhaus Roding und dem Krebsforschungslabor der Medizinischen Klinik in Erlangen.

30.09.66 Bestallung als Arzt.